

PENGHASILAN ANTIBODI PPSP1 DAN PPSP2

TERHADAP SEL MONONUKLEUS DARAH PERIFERI MANUSIA

DENGAN TEKNIK HIBRIDOMA

Norazmi Mohd. Nor, Jamaruddin Mat Asan,
Ahmad Tarmizi Abu Baker & Mustaffa Musa

Jabatan Immunologi,
Pusat Pengajian Sains Perubatan,
Universiti Sains Malaysia,
16150 Kubang Kerian,
Kelantan.

RINGKASAN

Dalam kajian ini, teknik hibridoma telah dilakukan untuk menghasilkan antibodi monoklon (mAb) mencit terhadap sel mononukleus darah periferi manusia (SMDP). Selepas hibridisasi sel limpa mencit yang diimmunisasi dengan sel mieloma dilakukan, sel hibridoma yang diperolehi didapati stabil dan mengeluarkan antibodi (Ab) yang berterusan. Dua hibridoma telah berjaya dihasilkan daripada pengklonan satu kultur awal berdasarkan analisis blot imunodot. Kedua-dua hibridoma ini menghasilkan Ab yang masing-masingnya dikenali sebagai PPSP1 dan PPSP2. Analisis selanjutnya melalui kaedah flow sitometri menunjukkan bahawa kedua-dua hibridoma ini menghasilkan Ab yang bertindak balas dengan antigen permukaan SMDP. Walau bagaimanapun, intensiti pewarnaan PPSP1 lebih tinggi daripada PPSP2. Lebih daripada 98% SMDP dilabel positif dengan PPSP1 dan PPSP2 iaitu setanding dengan keputusan apabila menggunakan mAb kontrol positif komersial, CD45. Penyelidikan seterusnya untuk menentukan PPSP1 dan PPSP2 adalah antibodi monoklon sedang dalam perancangan.

Kunci:

sel mononukleus darah periferi manusia, hibridoma, flow sitometri, blot imunodot.

SUMMARY

In this study, the hybridoma technique was employed to produce mouse monoclonal antibodies (mAb) against human peripheral blood mononuclear cells (SDMP). Cloning of immunised mouse spleen cells and myeloma cells resulted in hybrids continuously producing stable antibodies (Ab). Two Ab were successfully isolated from the cloning of an initial bulk culture based on immunodot blot analysis. These Ab were designated PPSP1 and PPSP2. Analyses by flow cytometry showed that both PPSP1 and PPSP2 reacted with surface antigens on SDMP although the staining intensity of PPSP1 was greater than PPSP2. More than 98% SDMP were positively labelled by PPSP1 and PPSP2 and the results were similar to the commercial control, CD45. Further confirmatory studies on the monoclonality of PPSP1 and PPSP2 are being planned.

Key words:

human peripheral blood mononuclear cells, hybridoma, flow cytometry, immunodot blot

PENDAHULUAN

Antibodi monoklon (mAb) telah lama digunakan dalam bidang perubatan sama ada untuk tujuan diagnosis penyakit atau penyelidikan. Dewasa ini mAb juga berpotensi sebagai bahan imunoterapi kerana ia adalah spesifik dan mempunyai reaktiviti silang yang amat rendah. MAb yang dihasilkan terhadap sel-sel dan bahan hasil sel sistem imun amat penting untuk mengenalpasti penyakit-penyakit imun seperti penyakit autoimun, penyakit tumor/kanser dan penyakit imunodefisiensi (1). Ketika ini, mAb terhadap leukosit manusia, terutamanya sel mononukleus penting dalam membantu diagnosis penyakit seperti AIDS, leukemia dan limfoma.

Setakat ini, kebanyakan mAb yang digunakan di negara ini hanya diperolehi secara komersial dan hal ini bukan sahaja melibatkan belanja yang mahal tetapi memerlukan masa yang lama untuk mendapatkannya. Teknik hibridoma untuk penghasilan mAb yang berterusan dan dalam jumlah yang banyak boleh dilakukan untuk mengatasi masalah yang disebutkan tadi. Teknik hibridoma iaitu melibatkan perlakuan sel *in vitro* telah lama dicipta oleh Kohler dan Milstien (2). Oleh itu, matlamat kajian ini adalah untuk menghasilkan mAb monoclonal terhadap sel mononukleus darah periferi manusia (SMDP) dengan teknik hibridoma.

BAHAN DAN KAEDAH

Imunisasi mencit terhadap SMDP

SMDP disediakan dengan teknik pengasingan kecerunan densiti Histopaque (Sigma) (3). SMDP (5×10^6 dalam 100 μ l PBS) disuntik ke dalam intra-peritoneum mencit (Balb/c). Mencit kontrol hanya disuntik dengan PBS. Proses ini diulangi pada hari ke 7 dan hari ke 14 selepas suntikan pertama. Pada hari ke 21, pendarahan melalui ekor dilakukan ke atas kedua-dua kumpulan mencit (kontrol dan ujian) untuk menentukan titer antiserum. Penentuan ini harus dibuat kerana titer yang tinggi perlu diperolehi sebelum perlakuan sel-sel limpa dengan sel mieloma (P3-X63-Ag8.653) boleh dilakukan. Pemilihan sel mieloma ini adalah kerana sel ini tidak menghasilkan serpihan immunoglobulin yang boleh mengganggu proses penyaringan. Sel mieloma P3-X63-Ag8.653 ini adalah daripada keturunan sel mieloma asal yang digunakan oleh Kohler dan Milstein (1) dan diperolehi daripada Profesor Nariuchi, Institute of Medical Science, Tokyo University, Jepun.

Perlakuan Sel dan Pembiakan Sel Hibrid

Perlakuan sel limpa dengan sel mieloma dilakukan berdasarkan teknik hibridoma yang standard (4). Secara ringkasnya, sel limpa (5×10^7 per ml) daripada mencit yang telah diimmunisasi dan sel mieloma (5×10^6 per ml) dicampurkan di dalam 0.5 ml larutan polyethylene glycol (PEG). Selepas lebih kurang 1 min, MEM dimasukkan ke dalam tabung uji ini secara tuisan perlahan-lahan (dalam jangka masa 10 min) sambil mengoncamp tabung uji sehingga isipadu ampaian menjadi 10 ml. Tabung uji diemparkan seperti tadi. Kemudian sel-sel diampalkan di dalam media HAT dan sel-sel yang bersaiz besar iaitu sel mieloma dan sel-sel hibrid dikira dan kepekataannya diselaraskan kepada 5×10^5 per ml. Ampaian sel ini (200 μ l/kolam) dimasukkan ke dalam plat 96-kolam (lantai rata) dan dieramkan di dalam inkubator CO_2 pada suhu $37^\circ C$.

Pengkulturan sel dilakukan dengan menukar media HAT setiap 2 atau 3 hari dengan mengeluarkan separuh daripada media lama dari setiap kolam dan menggantikannya dengan media HAT baru pada

BAHAN DAN KAADAH

Imunisasi mencit terhadap SMDP

SMDP disediakan dengan teknik pengasingan kecerunan densiti Histopaque (Sigma) (3). SMDP (5×10^6 dalam 100 μ l PBS) disuntik ke dalam intra-peritoneum mencit (Balb/c). Mencit kontrol hanya disuntik dengan PBS. Proses ini diulangi pada hari ke 7 dan hari ke 14 selepas suntikan pertama. Pada hari ke 21, pendarahan melalui ekor dilakukan ke atas kedua-dua kumpulan mencit (kontrol dan ujian) untuk menentukan titer antiserum. Penentuan ini harus dibuat kerana titer yang tinggi perlu diperolehi sebelum perlakuan sel-sel limpa dengan sel mieloma (P3-X63-Ag8.653) boleh dilakukan. Pemilihan sel mieloma ini adalah kerana sel ini tidak menghasilkan serpihan imunoglobulin yang boleh mengganggu proses penyaringan. Sel mieloma P3-X63-Ag8.653 ini adalah daripada keturunan sel mieloma asal yang digunakan oleh Kohler dan Milstein (1) dan diperolehi daripada Profesor Naruchi, Institute of Medical Science, Tokyo University, Jepun.

Perlakuan Sel dan Pembiakan Sel Hibrid

Perlakuan sel limpa dengan sel mieloma dilakukan berdasarkan teknik hibridoma yang standard (4). Secara ringkasnya, sel limpa (5×10^7 per ml) daripada mencit yang telah diimmunisasi dan sel mieloma (5×10^6 per ml) dicampurkan di dalam 0.5 ml larutan polyethylene glycol (PEG). Selepas lebih kurang 1 min, MEM dimasukkan ke dalam tabung uji ini secara titisan perlahan-lahan (dalam jangka masa 10 min) sambil mengoncong tabung uji sehingga isipadu ampaian menjadi 10 ml. Tabung uji diemparkan seperti tadi. Kemudian sel-sel diampai di dalam media HAT dan sel-sel yang bersaiz besar iaitu sel mieloma dan sel-sel hibrid dikira dan kepekatan diselaraskan kepada 5×10^5 per ml. Ampaian sel ini (200 μ l/kolam) dimasukkan ke dalam plat 96-kolam (lantai rata) dan dieramkan di dalam inkubator CO_2 pada suhu 37°C .

Pengkulturan sel dilakukan dengan menukar media HAT setiap 2 atau 3 hari dengan mengeluarkan separuh daripada media lama dari setiap kolam dan menggantikannya dengan media HAT baru pada

isipadu yang sama. Selepas dua minggu, media HAT diganti dengan media HT sahaja dan sel-sel ini dikultur semula seperti biasa. Selepas 1 minggu, media RPMI digunakan untuk menggantikan media HT. Kolam-kolam yang menunjukkan kehadiran pembiakan sel diuji supernatannya sebelum pengklonan dilakukan.

Pengklonan sel hibridoma

Setelah pengkulturan dilakukan selama 3 minggu, sel-sel yang hidup hanyalah sel-sel hibridoma. Sel-sel hibridoma diklon dengan prinsip cairan terhad iaitu dengan memasukkan satu sel hibrid ke dalam setiap kolam plat bersama-sama dengan 5×10^5 sel timus. Sel-sel hibrid ini dikultur seperti biasa selama 2 hingga 4 minggu sambil menukar media RPMI setiap 4 atau 5 hari. Apabila pertumbuhan sel berlaku pada mana-mana kolam, ujian penyaringan Ab dijalankan. Seterusnya, pengklonan selanjutnya juga dilakukan ke atas mana-mana klon yang positif.

Penyaringan dan Pencirian antibodi

Penyaringan dan pencirian supernatan daripada klon yang hidup amat penting untuk menentukan kespesifikan dan kehadiran antibodi. Dalam kajian ini, dua kaedah penentuan dijalankan iaitu teknik imunohistokimia yang menggunakan keseluruhan sel yang baru diperkenalkan dan teknik flow cytometry.

Teknik imunohistokimia

SMDP sebanyak 2×10^5 dalam PBS dititis ke atas kertas nitroselulosa berukuran 6mm X 6mm. Selepas dikeringkan pada suhu bilik selama 1 jam, pewarnaan imunohistokimia dilakukan. Dalam pewarnaan ini, kertas-kertas tadi direndam selama 30 min pada suhu bilik dalam 6% susu skim dalam 0.05M Larutan Penimbal Tris (TBS) pH 7.4. Setelah dibasuh dalam TBS selama 10 min dan diulang sebanyak dua kali, kertas-kertas ini dieram dalam Ab/antiserum (25ul) selama 1 jam pada suhu bilik. Kontrol positif menggunakan Ab CD45 (Dako), manakala kontrol negatif menggunakan Ab X63 (FMC). Kemudian kertas-kertas ini dibasuh seperti sebelum ini dengan antibodi berkonjugat biotin

(1:600)[Dako]) digunakan untuk eraman selanjutnya selama 30 min. Setelah dibasuh, kertas-kertas ini dieram dalam streptavidin berkonjugat alkalina fosfatase (1:100 [Dako]) selama 45 min pada suhu bilik. Akhirnya kertas-kertas ini dibasuh sekali lagi dan substrat Fast blue (Sigma) digunakan untuk mewarnakan tindak balas antibodi yang spesifik.

a. Teknik flow cytometri

Teknik ini berdasarkan pewarnaan imunopendaflor dan analisis dengan menggunakan alat FACScan (Becton Bickinson). Secara ringkasnya, di dalam tabung uji, sampel darah (100 µl) dicampurkan dengan setiap Ab (100 µl) yang dikaji. Sel darah merah kemudiannya dilisis dengan "FACSLysing Solution" (5ml) (Becton Dickinson). Leukosit yang diperolehi dibasuh dengan Larutan Penimbal Salin (PBS) sebelum Ab terhadap immunoglobulin mencit berkonjugat FITC [Becton Dickinson] ditambah. Setelah dibasuh sebanyak 3 kali dalam PBS, pewarnaan sel mononukleus yang di "gated" dianalisis dengan sofwer Simulset (Becton Dickinson).

KEPUTUSAN

Titer antiserum mencit sebelum perlakuan:

Sebelum perlakuan dilakukan, titer antiserum terhadap SDMP ditentukan terlebih dahulu. Ini untuk memastikan bahawa terdapat rangsangan yang secukupnya selepas imunisasi. Gambarajah 1 menunjukkan bahawa titer antiserum terhadap SDMP yang diperolehi melebihi 1:2000 iaitu selepas 3 minggu proses imunisasi dilakukan. Ini menunjukkan sel limpa mencit telah cukup dirangsang dan amat sesuai digunakan untuk perlakuan sel.

Saringan awal kultur hibridoma:

Sebelum pengklonan dijalankan, kultur-kultur awal mestilah disaring terlebih dahulu untuk memastikan bahawa terdapat klon-klon sel dalam setiap kultur yang menghasilkan Ab yang dikehendaki dan pada kepekatan yang tinggi. Dalam saringan awal yang telah dijalankan, lebih daripada 90% kolam menunjukkan keputusan positif. Dua daripada kultur awal yang memberikan pewarnaan yang kuat dipilih untuk pengklonan.

Saringan Ab daripada klon-klon sel:

Dalam kaedah cecair terhad, pengklonan (1 sel setiap kolam) dianggap berjaya sekiranya terdapat kurang daripada 63% kolam-kolam plat 96-kolam yang mempunyai sel yang hidup selepas 2 hingga 4 minggu (Poisson Distribution) (4). Kami memperolehi keputusan 38% dan 43% bagi kedua-dua plat yang mengandungi sel klon (iaitu probabiliti setiap kolam mempunyai satu klon sahaja adalah melebihi 99%). Saringan kolam-kolam tertentu perlu untuk menentukan kehadiran Ab terhadap SDMP. Saringan ini dilakukan sebaik sahaja jumlah sel yang terdapat dalam setiap kolam melebihi satu pertiga daripada keluasan kolam (dibuat secara visual). Didapati kebanyakan daripada klon-klon berkenaan tidak menghasilkan Ab yang dikehendaki. Walau bagaimanapun, hasil daripada teknik imunohistokimia (Gambarajah 2), dua kolam (1.C02 dan 1.G02) mempunyai klon masing-masing yang menghasilkan antibodi terhadap SDMP. Klon-klon yang positif ini diklon semula. Kami dapati

PERBINCANGAN

Teknik hibridoma telah dijalankan untuk menghasilkan Ab terhadap SMDP. Dalam kajian ini, pemilihan SMDP sebagai sumber antigen mempunyai dua sebab. Pertamanya, antigen permukaan sel tersebut adalah imunogenik dan proses saringan kehadiran Ab mudah dilakukan. Keduanya, Ab yang terhasil daripada kajian ini akan dapat digunakan untuk tujuan diagnosis imunofenotip makmal. Penghasilan mAb dalam teknik hibridoma perlu melibatkan kerja-kerja pengklonan melalui teknik cairan terhad (4). Selepas dua kali pengklonan dilakukan ke atas sel hibridoma yang diperolehi, dua klon sel telah didapati menghasilkan Ab terhadap SMDP. Kedua-dua Ab tersebut telah diberi nama PPSP1 dan PPSP2. Kedua-duanya daripada kelas IgG. Kehadiran Ab terhadap SMDP telah ditentukan dengan dua teknik iaitu teknik imunohistokimia menggunakan dot SMDP dan teknik immunoflow sitometri.

Teknik imunohistokimia dijalankan dengan menggunakan keseluruhan sel SMDP sebagai dot. Umumnya, teknik imunodot menggunakan pecahan protein. Penggunaan keseluruhan sel memberikan beberapa kelebihan. Di antaranya termasuk penyediaan dot yang lebih cepat dan mudah. Oleh kerana SMDP mengandungi peroksidase, pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan dalam kajian ini telah menggunakan alkalina fosfatase untuk mengatasi masalah pewarnaan latar belakang.

Reaktiviti Ab yang dihasilkan oleh kedua-dua klon tadi telah juga diamati dengan teknik imunofenotip berserta analisis flow sitometri. Dengan alat ini intensiti pewarnaan oleh setiap Ab dapat dibandingkan. Di samping itu, saizaran populasi sel yang diwarnakan dapat ditentukan. Keputusan kajian ini menunjukkan walaupun PPSP1 dan PPSP2 reaktif terhadap populasi SMDP, intensiti pewarnaan PPSP1 lebih tinggi berbanding PPSP2. Kemungkinan kedua-dua Ab ini reaktif terhadap antigen permukaan sel yang serupa tetapi afiniti gabungan PPSP1 lebih tinggi daripada PPSP2. Puncak pewarnaan kedua-dua Ab ini didapati serupa dengan kontrol mAb CD45. MAb CD45 adalah merupakan Ab yang reaktif terhadap antigen umum leukosit (leucocyte common antigen) (5). Kedua-

dua Ab ini berkemungkinan reaktif terhadap CD45 atau terhadap antigen histokompatibiliti utama kelas I yang terdapat pada semua leukosit (6). Berdasarkan kepada teknik pengklonan cairan terhadap puncak tunggal yang diperolehi, kemungkinan kedua-dua Ab yang terhasil dalam kajian ini merupakan mAb yang reaktif kepada antigen yang serupa adalah amat tinggi. Sekiranya klon hibridoma yang diperolehi menghasilkan lebih daripada satu Ab, beberapa puncak pewarnaan akan kelihatan daripada analisis flow sitometri kecuali masing-masing Ab mempunyai afiniti yang sama dan mewarnakan semua jenis sel dengan intensiti yang serupa. Walau bagaimanapun penemuan terperinci terhadap kedua-dua Ab PPSP1 dan PPSP2 tadi perlu dilakukan dalam kajian selanjutnya.

PENGHARGAAN

Penulis menghargai geran penyelidikan yang telah diberikan oleh Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang dan sehubungan dengan itu, artikel ini diterbitkan.

RUJUKAN

1. Thompson K.M. (1988): Human monoclonal antibodies. *Immunol. Today* 9(4): 113 - 116.
2. Kohler G. dan Milstein C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256: 495 - 497.
3. Norazmi M.N. (1991): Culture supernatants of human colonic carcinoma cell lines suppressed lymphocyte blastogenesis. *Diagnosis* 5(2): 29 - 37.
4. Zola H. (1988): Monoclonal antibodies: A manual of techniques. Flinders Medical Centre, Department of Clinical Immunology, Laboratory Manual.
5. Beverley P.C.L., Merckenschlager M. and Terry L. (1988): Phenotypic diversity of the CD45 antigen and its relationship to function. *Immunol. Suppl.* (1): 3-5.
6. Strominger J.L. (1987): Structure of class I and class II HLA antigens. *Br. Med. Bull.* 43: 81 - 93.

pengklonan kedua ini juga menghasilkan Ab yang memberikan keputusan imunohistokimia yang positif. Kedua-dua Ab ini telah dinamakan masing-masing sebagai PPSP1 dan PPSP2. Prefiks PPSP digunakan sempena nama Pusat Pengajian Sains Perubatan.

Penentuan reaktiviti Ab dengan teknik flow sitometri:

Reaktiviti kedua-dua Ab PPSP1 dan PPSP2 telah juga ditentukan dengan teknik flow sitometri. Kedua-dua Ab PPSP1 dan PPSP2 memberikan keputusan positif melalui teknik flow sitometri (Gambarajah 3) iaitu kedua-duanya bertindak balas dengan antigen permukaan SMDP. Didapati intensiti pewarnaan PPSP1 lebih tinggi daripada PPSP2. PPSP1 dan PPSP2 mewarnakan hampir kesemua SMDP iaitu lebih daripada 98% sebagaimana kontrol positif yang digunakan iaitu CD45. PPSP1 dan PPSP2 daripada pengklonan kedua klon-klon tadi juga memberikan reaktiviti yang serupa.

LEGENDA GAMBARAJAH

Gambarajah 1:

Titer antiserum mencit dikenalpasti melalui kaedah imunodot. Tindak balas antiserum terhadap antigen (SMDP) menyebabkan pewarnaan biru (kehitam-hitaman dalam gambar) pada antigen dan jelas bahawa titer mencit yang telah diimmunisasi melebihi 1:2000. Titer tinggi ini menunjukkan bahawa mencit ini telah dirangsang secukupnya dan perlakuan sel boleh dilakukan.













Gambarajah 2:

Penyaringan ke atas dua kultur awal (prefix 1 dan 2) untuk menentukan kehadiran Ab terhadap SMDP melalui kaedah imunodot. Kebanyakan daripada supernatan kolam-kolam tidak mempunyai Ab iaitu tindak balas serupa seperti kontrol negatif pada kertas nombor 1 dan 2. Dua kolam iaitu 1.C02 dan 1.G02 menunjukkan keputusan positif yang tinggi yang serupa dengan kontrol positif, CD45, pada kertas nombor 3. Ab-Ab daripada kolam-kolam ini masing-masing dinamakan PPSP1 dan PPSP2.

Gambarajah 3:

Reaktiviti PPSP1 dan PPSP2 terhadap SMDP melalui kaedah flow sitometri. Kedua-dua PPSP1 dan PPSP2 mewarnakan hampir kesemua SMDP apabila dibandingkan dengan kontrol negatif, X63 dan kontrol positif, CD45. Walau bagaimanapun, intensiti pewarnaan PPSP1 lebih tinggi daripada PPSP2.

Cairan Serum

	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:2000
Mencit yang disuntik dengan PBS					
Mencit yang disuntik dengan SMDP					
Kontrol negatif (X63)			Kontrol positifif (CD45)		
					

Media	X63	CD45	2.E03	1.A03	1.A08	1.F04	1.F02	1.E03	2.E11
1.F11	2.F12	1.A10	1.C11	2.A10	1.D05	2.C03	1.H02	1.C04	1.E06
2.D11	1.G03	2.F02	2.G08	2.B07	1.H03	1.C02	1.B08	1.C07	2.C04
1.A02	1.F01	2.C02	2.D09	1.G05	1.G02	1.B02	2.B11	1.H11	2.H08

